

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

10/509576

24 SEP 2004
24.09.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed
with this Office

出願年月日

Date of Application:

2002年 4月 3日

REC'D 16 MAY 2003

PCT

出願番号

Application Number:

特願2002-101134

[ST.10/C]:

[JP2002-101134]

出願人

Applicant(s):

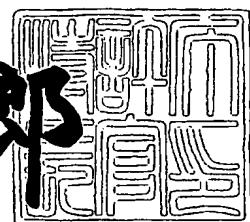
科学技術振興事業団

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 5月 2日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

太田信一郎



出証番号 出証特2003-3031601

【書類名】 特許願
 【整理番号】 200204009
 【提出日】 平成14年 4月 3日
 【あて先】 特許庁長官殿
 【国際特許分類】 C09K 3/00
 G01N 21/00
 G01N 33/50

【発明者】

【住所又は居所】 東京都中野区上鷺宮5-17-22
 【氏名】 片岡 一則

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県守谷市けやき台3-5-17
 【氏名】 長崎 幸夫

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市吾妻1-16-2 402-207
 【氏名】 大塚 英典

【発明者】

【住所又は居所】 千葉県柏市柏2-5-7-301
 【氏名】 内田 勝美

【発明者】

【住所又は居所】 埼玉県北葛飾郡鶴宮町上内1221-1
 【氏名】 石井 武彦

【発明者】

【住所又は居所】 宮城県古川市城西1-8-25
 【氏名】 鈴木 祐子

【特許出願人】

【識別番号】 396020800
 【氏名又は名称】 科学技術振興事業団

【代理人】

【識別番号】 100060782

【弁理士】

【氏名又は名称】 小田島 平吉

【選任した代理人】

【識別番号】 100094293

【弁理士】

【氏名又は名称】 藤井 幸喜

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 019666

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【ブルーフの要否】 要

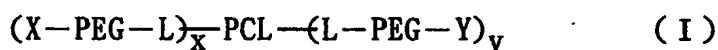
【書類名】 明細書

【発明の名称】 ポリエチレングリコール化ナノ粒子を担持するバイオセンサー
チップ表面

【特許請求の範囲】

【請求項1】 構造式I

【化1】



[式中、PCLは自由電子金属微粒子、金属酸化物微粒子または半導体微粒子を表し、

Xはバイオセンサーチップ表面に結合することのできる機能性部分を表し、

YはXの機能性部分を形成するのに使用できる保護されていてもよい官能基を有する部分またはXと同一もしくは異なる機能性部分を表し、

LはPCLに結合する結合部分を表し、

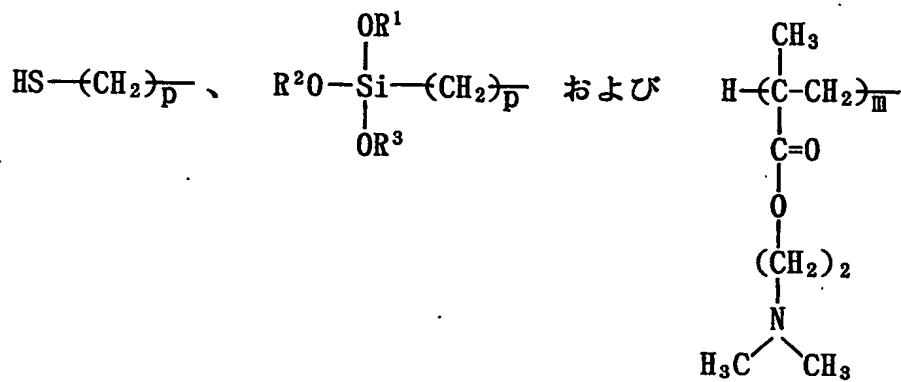
PEGは、エチレンオキシド単位： $(-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-)_n$ （ここで、nは5～10,000のいずれかの整数である。）を表し、そして

xおよびyは、独立して1以上の整数であり、かつ、一緒になってPEG鎖が水性媒体中でPCLの表面を被覆するのに十分な整数を表す]で表されるポリエチレングリコール化ナノ粒子を該X部を介して表面に担持するバイオセンサーチップ表面。

【請求項2】 ナノ粒子が被検試料と接触する表面全体を被覆するように担持された請求項1記載のバイオセンサーチップ表面。

【請求項3】 構造式Iにおける-L-が

【化2】



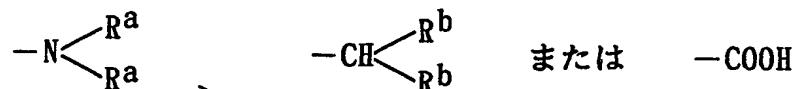
からなる群より選ばれる基を介する結合を表し、かつ、ここで p は 2 ~ 12 のいずれかの整数を表し、 R^1 、 R^2 および R^3 は独立して $\text{C}_1 \sim \text{C}_6$ アルキル基を表し、そして m は 2 ~ 100 のいずれかの整数を表す、請求項 1 または 2 記載のバイオセンサーチップ表面。

【請求項 4】 構造式 I における X が生物学的な特異的結合対を形成する一員を有する部分である請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載のバイオセンサーチップ表面。

【請求項 5】 X がビオチニル基を有する請求項 4 記載のバイオセンサーチップ表面。

【請求項 6】 構造式 I における Y が基

【化3】



を有する部分であって、 R^a は独立して、水素原子または $\text{C}_1 \sim \text{C}_6$ アルキル基を表し、 R^b は独立して $\text{C}_1 \sim \text{C}_6$ アルキルオキシまたは 2 つの R^b が一緒になってオキシもしくは $\text{C}_1 \sim \text{C}_6$ アルキルで置換されていてもよいエチレン基を形成する原子団を表すか、あるいはビオチニル基またはビオチニル基以外の生物学的な特異的結合対を形成する一員を表す請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載のバイオセンサーチップ表面。

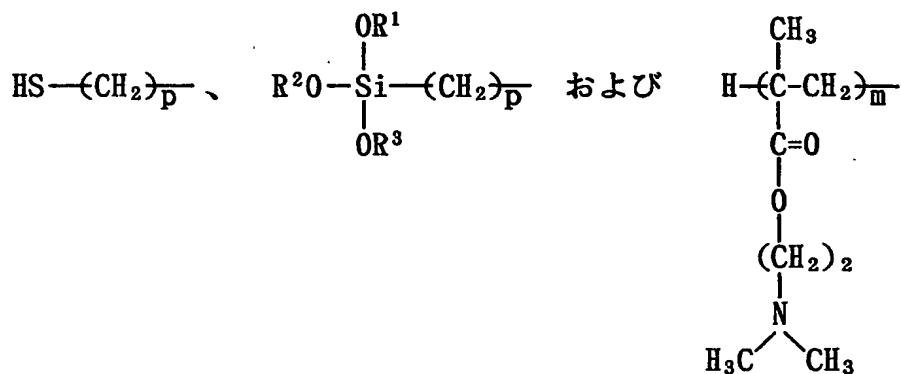
【請求項7】 構造式Iにおける $(X-PEG-L-)_x$ および $(-L-PEG-Y)_y$ 部分が一般式(II)

【化4】



[式中、 L_1 は

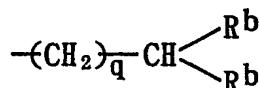
【化5】



からなる群より選ばれ、 W は $-COO-$ (酸素原子を介してエチレンオキシド単位に結合する)、 $-O-$ または $-S-$ を表し、 p 、 m 、 n 、 R^1 、 R^2 および R^3 前記定義と同義であり、

L_2 は水素原子、

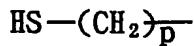
【化6】



またはリガントとレセプターのいずれかを表し、 q は 2 ~ 6 のいずれかの整数であり、 R^b は前記定義と同義である] のポリマーを L_1 部分を介して PCL に担持させたポリエチレングリコール化ナノ粒子から形成される請求項 3 ~ 6 のいずれかに記載のバイオセンサーチップ表面。

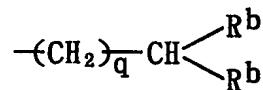
【請求項8】 ポリマーが、 一般式(II)における L_1 が

【化7】



であり、L₂の一部が

【化8】



を有する部分であり、その残りがビオチニル基を有する部分であるか、またはL₂の全部がビオチニル基を有する部分である請求項7記載のバイオセンサー表面

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、バイオセンサーの分野に関し、より具体的には、生物学的流体等に含まれる被検体以外の夾雑物による非特異吸着もしくは結合を低減もしくは防止するバイオセンサー表面に関する。

【0002】

【従来の技術】

生物学的試料中に存在する被検体を検出する方法として、多種多様な検出様式をもつバイオセンサーが提案されている。そのようなバイオセンサーの中で、表面プラズモン共鳴(SPR)を利用するセンサーは、金属薄膜の表面およびその近傍における屈折率変化に対して敏感である(例えば、A. Szabo et al., Curr. Opin. Strnct. Biol. 5 (1995) 699-705参照)。SPRは、表面と複雑な生物学的溶液との間で生じる過程のインサイチュ(in situ)での観察が可能であり、そして例えば標識を使用することなくリアルタイムに被検体からのデータが入手できるので、動力学的および熱力学的なパラメーターを取得するのに適していることから注目を集めているセンサーの一つである。

【0003】

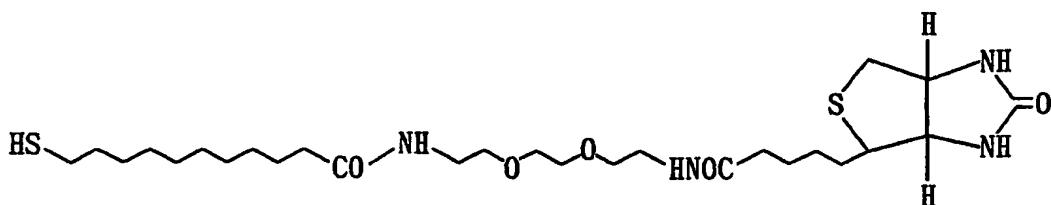
このような表面をもつバイオセンサーチップの典型的なものとしては、アマシヤム ファルマシア バイオテク（株）から入手できるB I A C O R E（商標）がある。このB I A C O R Eは、末端がカルボキシル化されたデキストランのマトリックスが半透明の状態で金の薄膜上に固定されている。かのような検出表面を特許請求すると思われるものとしては特許第2815120号（U.S. Patent No.5,242,828およびE P O 589 867 B1に対応する）公報がある。該公報によれば、HS-R-Y（Rは10原子を越える鎖の長さを有し、ヘテロ原子で中断されていてもよい炭化水素鎖であり、Yはリガンド又は生適合性多孔質マトリックスを共有結合させるための活性基である）で表される有機分子を用いて、そのチオール（またはメルカプト）基を介して金、銀などの自由金属の膜表面へ結合させて密に詰め込まれた単層で該表面を被覆し、次いで、生適合性多孔質マトリックスとして、リガンドを結合させるための官能基を有していてもよいアガロース、デキストラン、ポリエチレングリコール等からなるヒドロゲルを共有結合した表面が記載されている。

【0004】

特許第3071823号（U.S. Patent No.5763191およびE P O 574 000 B1に対応）には、保持材上へ硫黄原子（メルカプト基の）を介して結合したスペーサー分子（炭素原子数1～30のアルキレン鎖）に親水性リンカ一部（鎖長4から15原子の直鎖分子）と固相反応物質（ビオチン誘導体残基）が順に共有結合した表面が記載されている。そして、かのような表面を形成するビオチニル化化合物の典型的なものとして、次式で表される化合物が記載されている。

【0005】

【化9】



【0006】

該表面の固相反応物質を有する分子鎖は、さらに固相反応物質（すなわち、上式の例では、ビオチン誘導体残基）を有しないか、または固相反応物質も親水性リンカーも有しない希釈分子によって希釈されていてもよい。

【0007】

Roberts et al., J. Am. Chem. Soc. 1998, 120, 6548-6555には、HS-スペーサー分子（炭素原子数11のアルキレン鎖）-親水性リンカー（エチレンオキシド単位3個または6個からなる鎖）-をベースとする化合物を用い、メルカプト基を介して金表面に自己集成した单層が記載されている。また、親水性リンカー部がエチレンオキシド単位3個の化合物と、エチレンオキシド単位6個（末端にオリゴペプチドのリガンドが結合している）の化合物との混合物から形成された表面は、細胞のリガンド特異的結合を促進するが、付着した細胞によるタンパク質の堆積を低減することも教示されている。

【0008】

他方、バイオアッセイにおける標識として用いる金属粒子の表面をポリエチレングリコール（またはポリエチレンオキシドともいう）のような水溶性で、かつ、水性媒体中でモビリティの高いポリマー鎖で修飾し、該粒子の分散安定性を改善する方法 (W. Pwelfine et al., J. Am. Chem. Soc. 120 (48), 12696-12697 (1998)) や、金属粒子表面に結合したポリエチレングリコールの該結合部位の他の末端に機能性化合物の残基を有するポリエチレングリコール化金属粒子も水性媒体中で分散安定性を示すものとして知られている (otsuka et al., J. Am. Chem. Soc. 2001, 123, 8226-8230)。

【0009】

【発明の構成】

本発明者らは、意外にも、後者のような水性媒体中で分散安定性を示す特有の構造を有するポリエチレングリコール化金属微粒子をバイオセンサーチップ表面に担持させ、該粒子で表面を被覆すると、上述のBIACORE等の表面に優るとも劣らない、望ましくないタンパク質等の非特異吸着が低減した、表面が得られることを、今ここに見出した。さらに、かような表面をSPRを利用するセン

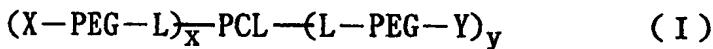
サーチップ表面に応用すると、S P Rセンサー チップ表面と該ポリエチレン化金属粒子との間の相互作用により感度を飛躍的に高めうることも見出した。

【0010】

本発明は、かのような知見に基づくものであり、したがって、本発明では、構造式 I

【0011】

【化10】



【0012】

[式中、P C Lは自由電子金属微粒子、金属酸化物微粒子または半導体微粒子を表し、

Xはバイオセンサー チップ表面に結合することのできる機能性部分を表し、

YはXの機能性部分を形成するのに使用できる保護されていてもよい官能基を有する部分またはXと同一もしくは異なる機能性部分を表し、

LはP C Lに結合する結合部分を表し、

PEGは、エチレンオキシド単位： $(-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-)_n$ （ここで、nは5ー、好ましくは10～10,000のいずれかの整数である。）を表し、そしてxおよびyは、独立して1以上の整数であり、かつ、一緒になってPEG鎖が水性媒体中でP C Lの表面を被覆するのに十分な整数を表す]で表されるポリエチレングリコール化ナノ粒子を該X部を介して表面に担持するバイオセンサー チップ表面が提供される。

【0013】

【発明を実施するための好適な形態】

本発明に従うバイオセンサー チップ表面は、主としてS P Rを応用したバイオセンサー表面について特に熟慮しているが、所謂、生物学的な特異的結合対、より具体的には非共有結合対を形成する構成員、リガントとレセプター、例えば、抗原もしくはハプテンと抗体、糖とレクチン、基質と酵素、ホルモンとその受容体、オリゴヌクレオチドとその相補鎖、のごとき結合対の形成を介して、表面

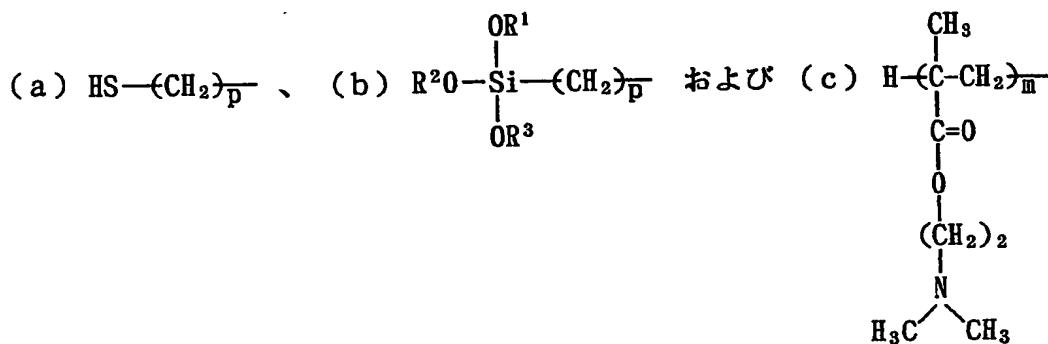
に生じる何らかの変化がトレースできるバイオセンサーチップ表面であればいかなるものであってもよい。したがって、本発明にいう生物学的な特異的結合対の一員は、上記構成員のいずれか一方の構成員であることができる。トレースできるシグナルとしては、放射能、接触角、沈降、紫外分光、ラマン散乱、表面プラズモン共鳴等の変化であることができる。

【0014】

本発明に従う表面の形成に用いることのできるポリエチレン化ナノ粒子を作成するためのポリマーは、構造式Iにおける-L-が、

【0015】

【化11】



【0016】

からなる群より選ばれる基を介する結合を表し（ここでpは2～12のいずれかの整数を表し、R¹、R²およびR³は独立してC₁～C₆アルキル基を表し、そしてmは2～、好ましくは5～100のいずれかの整数を表す。）、PEGがエチレンオキシド単位：(-CH₂CH₂O-)n（ここで、nは5～、好ましくは10～10,000のいずれかの整数である。）であり、そしてXはバイオセンサーチップ表面に結合することのできる機能性部分を表し、YはXの機能性部分を形成するのに使用できる保護されていてもよい官能基を有する部分またはXとは別の機能性部分を表すものを挙げることができる。

【0017】

上記(a)、(b)および(c)からなる群より選ばれる「基を介する結合を表し」とは、(a)または(c)にあっては、PCLで表示されている、例えば

、自由電子金属（例、金、銀、白金、アルミニウム、銅、等）の微粒子表面または半導体微粒子（例、CdS、ZnS、CdSe、ZnSe、InAs、等）には（a）のHS-基を介するか、または（c）の-N(CH₃)₂基を介する化学結合（もしくは化学吸着）を生じる結合、ならびに（b）にあっては、例えば、金属酸化物（例、酸化チタン、等）の水酸化により生じる表面-OH基と（b）の-Si(OR¹)(OR²)(OR³)との間の脱アルコール反応を伴うシリル化により形成される結合を意味する。

【0018】

上記ポリマーを特定する部分または基におけるC₁～C₆アルキル基は、後述するC₁～C₆アルキルオキシ基におけるアルキル部と共通し、メチル、エチル、n-プロピル、iso-プロピル、n-ブチル、sec-ブチル、n-ヘキシル等を意味する。

【0019】

また、構造式IにおけるXについての「バイオセンサーチップ表面に結合することのできる機能性部分」とは、チップ表面の性質によって変動しうるが、チップ表面上が上述の生物学的な特異的結合対の一員を担持する場合には、その一員と前記結合対を形成する他の一員であることができる。該チップ表面上の結合対の一員は、通常、チップ表面上に適当な結合手段を介して担持させることができ。限定されるものでないが、チップ表面が金等の自由電子金属製である場合、例えば、N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネートを表面に固定させることにより活性エステル基を導入し、こうして導入した活性エステル基を利用して前記結合対の一員（例、ストレプトアビシン）を担持させることができる。また、かようなチップ表面は、上述した、EPO 589 867 B1、EPO 574 000 B1に記載される表面であってもよい。

【0020】

チップ表面が、前記結合対の一員として、例えば、ストレプトアビシンを担持する場合には、構造式IにおけるXは、ビオチン残基を機能性部分として有することができる。こうして、構造式Iで表されるポリエチレングリコール化ナノ粒子は、アビシンとビオチンとの特異的結合対の形成により、該粒子を表面に担持

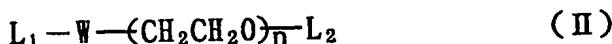
するバイオセンサーチップ表面が提供できる。本発明に従えば、アビジンとピオチンとの特異的結合対の形成と同様に、抗体と抗原もしくはハプテンとの特異的結合対、糖とレクチンとの特異的結合対、オリゴヌクレオチドとその相補鎖との結合対を、いずれの構成員の一員をチップ表面に担持させ（これらは、上述のような活性エステル基の利用に準じて行うことができる。）、他の構成員の一員を構造式ⅠにおけるXの機能性部分となる特異的結合対を形成する一員とすることができる。さらに、適当な場合には、構造式ⅠにおけるXの官能基を利用する共有結合を介してチップ表面にポリエチレングリコール化ナノ粒子を固定してもよい。

【0021】

一方、限定されるものでないが、Y部分は、ポリエチレン化ナノ粒子を作成するためのポリマーの前駆体として、一般式（II）

【0022】

【化12】

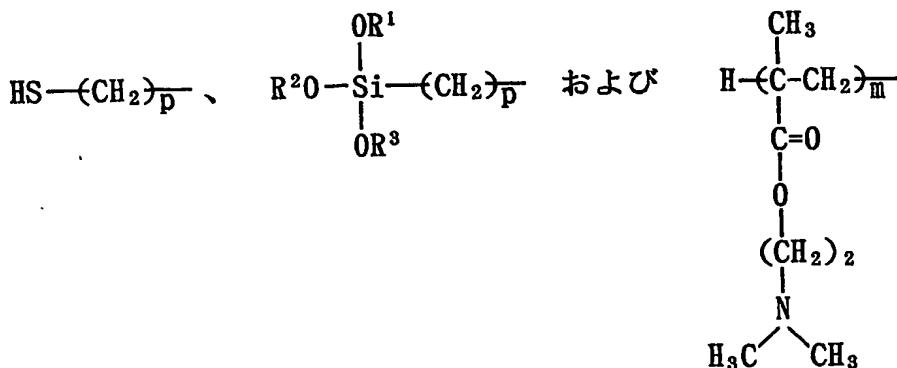


【0023】

[式中、 L_1 は

【0024】

【化13】



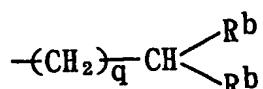
【0025】

からなる群より選ばれ、Wは-COO-（酸素原子を介してエチレンオキシド単位に結合する）、-O-または-S-を表し、p、m、n、R¹、R²およびR³前記定義と同義であり、

L₂は水素原子、または

【0026】

【化14】



【0027】

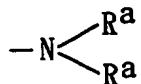
を表し、qは2～6のいずれかの整数であり、R^bは独立して、C₁～C₆アルキルオキシまたは2つのR^bが一緒になってオキシを表すかもしくはC₁～C₆アルキルで置換されていてもよいエチレン基を形成する原子団を表すポリマーを用い複数の該ポリマーを、上述したようにL₁部分を介してPCL表面に結合させた後、L₂部分の一部または全部を用いて、前記X部分を作成するか、またはL₂部分の一部を用いる場合にはその前もしくは後に残りのL₂部分をそのまま残存させるか、さらに水素原子または-(CH₂)_q-CH(R^b)₂を利用してY部分を作成すればよい。

【0028】

前記X部分の作成は、L₂部分、例えば、-(CH₂)_q-CH(R^b)₂の一部または実質的に全部を-(CH₂)_q-CHO (R^bが一緒になってオキシを表す場合に相当する)に転化した後、ビオチニル化（例えば、ビオチンヒドラジドを反応させ、次いで還元する）し、前者の場合には、L₂の残りの-(CH₂)_q-CH(R^b)₂または水素原子をそのまま残存させるか、あるいは、-(CH₂)_q-CH(R^b)₂もしくは水素原子の場合の結合基(-CH₂CH₂OH)から、それ自体既知の加水分解、酸化またはアミノ化反応を介して、Y部分とすることができます。こうして、Y部分は、水素原子、-COOH、

【0029】

【化15】



【0030】

(ここで、 R^{a} は独立して水素原子または $\text{C}_1\sim\text{C}_6$ アルキルを表す) または $-(\text{C}\text{H}_2)_q-\text{CH}(\text{R}^{\text{b}})_2$ (ここで、 R^{b} は前記定義と同義である) であることができる。Y部分が、生物学的な結合対を形成する一員である場合は、上述のXの作成と同様に、残存している $-(\text{C}\text{H}_2)_q-\text{CH}(\text{R}^{\text{b}})_2$ の全部または一部を $-(\text{C}\text{H}_2)_q-\text{CHO}$ に転化し、該アルデヒド基を介するシップ塩基の形成、還元反応を経て、抗原、抗体、その他の前記結合対の一員を導入することができる。

【0031】

なお、かようなポリマーの前駆体における L_2 部分を、予め、X部分等に改変した後、上述したように L_1 部分を介してPCL表面に結合させることにより本発明に従うポリエチレングリコール化ナノ粒子を調製してもよい。

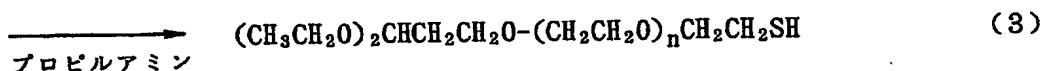
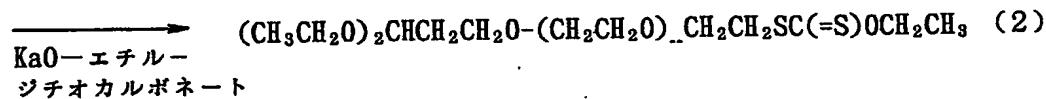
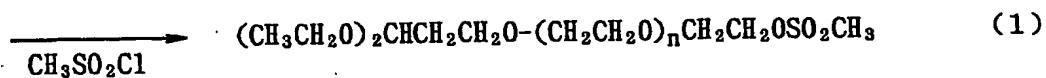
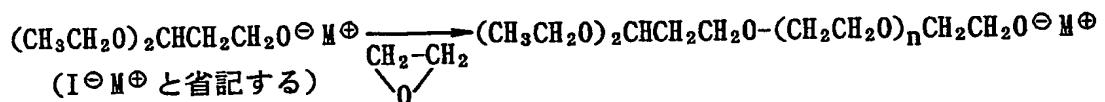
【0032】

上述の前駆体ポリマーは、公知であるか、公知のポリマーの製造方法に従って得ることができる。限定されるものでないが、以下の反応スキームに従って製造することが好都合であろう。

反応スキームI:

【0033】

【化16】

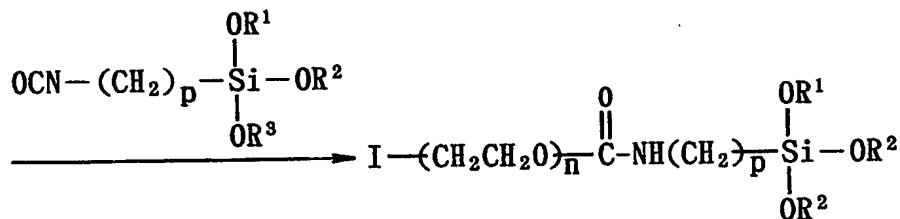
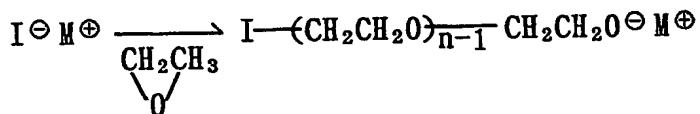


【0034】

反応スキーム I I - a :

【0035】

【化17】

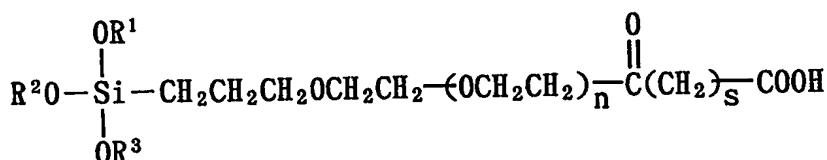
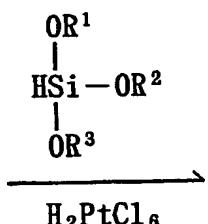
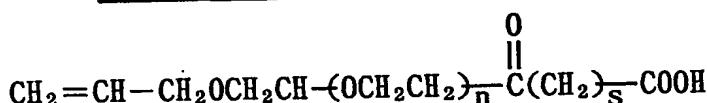
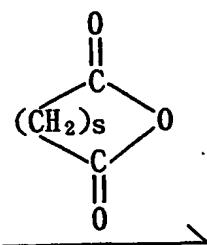
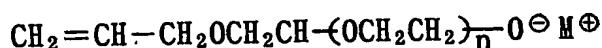
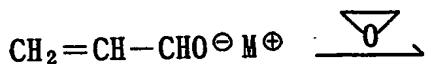


【0036】

反応スキーム I I - b :

【0037】

【化18】



【0038】

(以上の各式中の略号は、Mはカリウム、ナトリウム、リチウムを表す。)

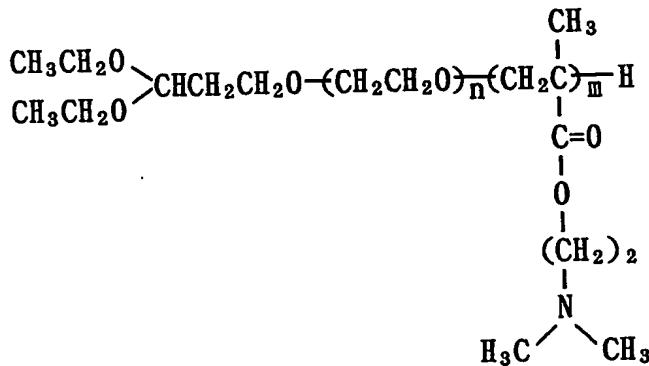
以上のリビング重合工程は、それ自体公知の反応条件の下で実施できる(例えば、WO 96/32434、WO 97/06202、等を参照されたい。)。その他は、後述する実施例に従い、または記載されている条件を改変して実施できる。

【0039】

また、式

【0040】

【化 19】



[0 0 4 1]

は、本発明者らの一部による Kataoka et al., Macromolecules, 1999, 32, 6892-6894に記載の方法に従って得ることができる。PEG M_w = 5000 g/mol、PAMA (ポリ [(2-N,N-ジメチルアミノ)エチルメタクリレート]) の重合度m = 68) を後述するポリエチレングリコール化微粒子の作成に用いる。

[0042]

構造式 I における P C L を構成する自由電子金属微粒子、金属酸化物微粒子または半導体微粒子は、それぞれ、市販品を利用するか、それぞれ相当するコロイドを形成することにより得た微粒子を利用することができます。また、本発明に従うポリエチレングリコール化ナノ粒子は、例えば、それぞれ相当する微粒子（例えば、 $1 \text{ nm} \sim 1 \mu\text{m}$ 、好ましくは $1 \text{ nm} \sim 200 \text{ nm}$ の平均粒径）を形成する工程中に上述の前駆体ポリマーを共存させて形成することにより、前駆体ポリマーが微粒子表面に結合した、構造式 I の表面またはその前駆表面を作成することもできる。

[0043]

なお、構造式Ⅰにおけるxおよびyが、一緒になって、PEG鎖が水性媒体中でPCL表面を被覆するのに十分な整数を表すか否かは、センサーチップとしてSPRを利用するチップ上形成される表面への、例えば、ウシ血清アルブミン(BSA)の結合が、少なくとも上述のBIACOREの表面より少なくなるか否

かにより判断できる。

【0044】

こうして本発明によれば、生物学的流体（例えば、血清、血漿、尿、唾液、等）に含まれる目的とする被検体以外の夾雜タンパク質等の非特異吸着を低減させた表面が提供するとともに、さらに、例えば、Yが抗体等の生物学的な特異的結合対の一員である場合は、結合対の他の一員を被検体とするバイオセンサーシステムを提供することもできる。

【0045】

【実施例】

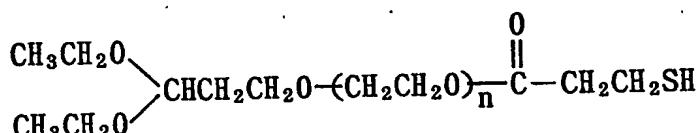
以下、具体例を挙げてさらに本発明を具体的に説明する。

例1：ポリエチレングリコール化金微粒子の製造法（その1）：

使用ポリマー：Acetal-P E G-S H ($M_n = 5000$)

【0046】

【化20】



【0047】

Acetal-P E G-S H : H A u C l ₄ = 1 / 6 : 1 (モル比) の比で混合した水溶液に H A u C l ₄ に対して 10 倍モル量の N a B H ₄ を添加し、還元法により金コロイドを調整した。末端アセタール基を p H 2 塩酸で処理しアルデヒド基に返還後、p-アミノフェニル-β-D-ラクトピラノシドと反応し、ラクトース-P E G-S H で修飾した金コロイド水溶液（平均粒径：8.7 nm）を得た。

【0048】

なお、アセタール-P E G-S H は、下記のとおりに製造した。

【0049】

アルゴン置換した受器中に蒸留テトラヒドロフラン (T H F) 20 m l と開始剤 3,3-ジエトキシ-1-プロパノール 0.2 mm o l (0.032 m l) を加え、さらに当量のカリウムナフタレンを加えて 15 分攪拌することでメタル化を

行った。その後、エチレンオキシド 22.7 mmol (1,135 ml) を加え、室温で 2 日間攪拌し重合させた。停止剤として N-スクシンイミゾール-3-(2-ピリジルチオ) プロピオネート (SPDP) 0.4 mmol (0.125 g) を少量の蒸留 THF に溶解させ、この溶液に対し前記の重合反応溶液を等圧滴下漏斗にて氷冷下で滴下した。一晩攪拌して停止反応を行った後に、飽和食塩水洗浄・クロロホルム抽出、エーテル再沈、ベンゼン凍結乾燥を経て、ポリマーを回収した。回収したポリマーは $^1\text{H-NMR}$ にて構造を確認し、末端に導入された SPDP 残基の量は、2-メルカプトエタノールと反応させることによって遊離した 2-チオピリドンの UV 吸収によっても確認した。

【0050】

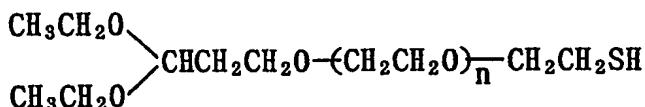
PEG-SS-Py 2.0×10^{-2} mmol (100 mg) を蒸留水 4 ml に溶解させ、さらに 5 倍 mol 量のジチオトレイトル 0.1 mmol (15.42 mg) を加え、室温で 30 分攪拌した。反応後、飽和食塩水洗浄・クロロホルム抽出・エーテル再沈を経てポリマー（以下、PEG 5000 と略記する）を回収した。回収したポリマーは $^1\text{H-NMR}$ によって構造を確認し、さらに 2-ピリジルジスルフィド (2-PDS) との反応により、末端 SH 基の定量を行った。

例 2：ポリエチレングリコール化金微粒子の製造法（その 2）：

使用ポリマー：Acetal-PEG-SH ($M_n = 3200$)

【0051】

【化 21】



【0052】

(1) 使用ポリマーの製造

反応スキーム I に従い、開始剤に 3,3-ジエトキシ-1-プロパノール、停止剤にメチルスルフォニルクロライドを用いてアセタール基とメチルスルホニル基を有するヘテロ二官能性 PEG をアニオン重合により合成した。さらに、テトラヒドロフラン (THF) 中でカリウムオルトエチルジチオカルボネートと室温

で3時間反応させることによって、メチルスルホニル基をエチルジチオカルボネート基に転化したポリマーを得た。

【0053】

その後、同じくTHF中でプロピルアミンとの反応によって上式で示される α -末端にメルカプト基を有するヘテロ二官能性PEG(Acetal-PEG-SH)を得た。

(2) 金粒子のポリエチレングリコール化

Acetal-PEO-SH ($M_n = 3200$) とアセタール-PEO-OH(比較例) ($M_n = 3000$) を、それぞれポリマーと金粒子とのモル比が $5.0 \times 10^6 : 1$ になるように測りとり純水2.0mLに溶解させた。そして、NaOH溶液にてpH6.5に調製し、金コロイド1.0mL (2.58×10^{-13} mol、pH6.5) を加え室温で3時間激しく攪拌させた。次いで、遠心分離[42,000g(gは重力加速度)、30分]後、溶液を取り除き、残渣にTHF3mLを加えて超音波をかけて再分散させた。これらのサンプルについてUVを用いて特性解析を行った。

【0054】

このポリマーを用いた金粒子の調製においては、遠心分離後、THF溶液に再分散させたときのUV-visスペクトルから、未修飾の金粒子のUVスペクトルは、粒子の凝集に基づく600nm以上に大きな吸収ピークを示していることが確認できた。Acetal-PEO-OH(比較例)で処理した金粒子は、未修飾の金粒子のUVスペクトルのように600nm以上に大きなピークを持たなかったものの、全体的にピークが高波長側へシフトし多少微粒子分散が不安定化していることが確認された。他方、遠心操作後、pH3の水溶液中に再分散させた時もAcetal-PEG-SHのみが非常に安定であり、ベンゼンを用いた凍結乾燥後の再分散性もよいことが確認できた。

(3) ポリエチレングリコール化金微粒子の特性(ゼータ電位)

通常の金微粒子の水溶液分散系では粒子表面を負に荷電させることによりそのチャージ反発により分散安定化させているのに対し、PEG化金微粒子ではその表面に全くチャージがないことがゼータ電位測定(大塚電子:ELS8000)。

により確認された。すなわち、市販の金微粒子は -34.5 mV であるのに対し、今回作成した金微粒子-ヘテロPEG複合体(Acetal-PEG-SH/Au)では -0.86 mV となっており、殆ど誤差の範囲で粒子表面にチャージがないといえ、表面がPEG鎖で覆われているものと推測される。

【0055】

測定データを表1に示す。

【0056】

【表1】

表1：アセタールーPEG-SH/Au 粒子のゼータ電位

サンプル	ゼータ電位 (mV)
未修飾金粒子	-34.5
アセタールーPEG-SH/Au	-0.86 (3回の平均値)

【0057】

測定溶液：

緩衝剤 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ と $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ を 10 mM （モル濃度）加え、そのイオン強度を 0.015 、pHを 7.5 に調整したリン酸緩衝溶液。

【0058】

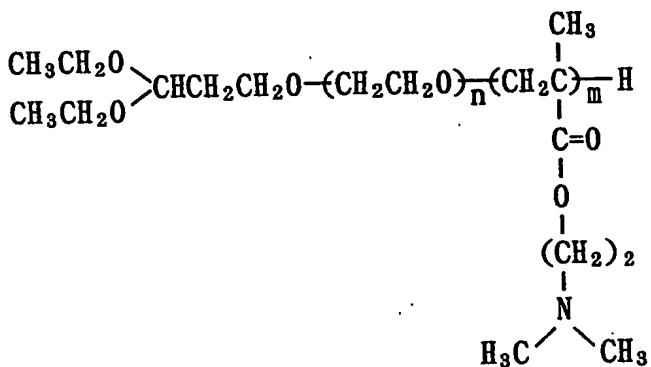
測定機器：ELS-8000（大塚電子）

例3：ポリエチレンギリコール化金微粒子の製造法（その3）：

この例では、使用ポリマー(Acetal-PEG-PAMA)：

【0059】

【化22】



【0060】

(上述の Kataoka et al., Macromolecules, 1999, 32, 6892-6894 に記載の方法に従って得られた。PEG Mw = 5000 g/mol, PAMA (ポリ [(2-N,N-ジメチルアミノ)エチルメタクリレート]) の n = 130, m = 100) を用いポリエチレングリコール化CdS 半導体微粒子を作成した。2.5 mg/mL の塩化金酸 (HAuCl₄) 水溶液 1 mL と、6 mg/mL のアセタール-PEG/PAMA ブロック共重合体水溶液 5 mL (NH₃:Au = 8 : 1) を混ぜ室温で 24 時間攪拌した。所定時間ごとに UV-vis スペクトルを測定したところ、金微粒子に由来する 540 nm のピークが次第に上昇し、還元剤を加えない状態で金コロイド粒子 (微粒子) 分散体が生成していることが確認された。この溶液を光散乱により測定 (DLS: 動的光散乱) したところ、平均粒径 12 nm の单分散コロイド粒子が生成していることが確認された。

【0061】

さらに、透過型電子顕微鏡によって、完全に均一な粒子が生成していることが確認された。この溶液を pH = 2 ~ 10 の範囲で変化させ、1 日放置しても全くスペクトルに変化は見られず、この系で極めて安定な金コロイド粒子 (微粒子) が得られたことが確認された。

【0062】

この溶液にブロック共重合体の 10 倍当量の 1,2-ジアミノ-4,5-ジメト

キシ2塩酸塩（DDB）を添加し、NaClによってpHを2.45に調整した。溶液を分画分子量500の透析膜にて透析し、励起波長269nmで蛍光測定した結果、410nmに強い蛍光を示した。この結果より、調整された金粒子表面にAcetal-PEG/PAMAブロック共重合体の末端アセタール基がアルデヒド基に変換され、DDBと効率的に反応していることが確認された。こうして形成したアルデヒド基を介して各種の機能性部分をもたらすことができる。

例4：ポリエチレングリコール化半導体微粒子の製造：

蒸留水80mL中に上述のAcetal-PEG/PAMAブロック（ 4.19×10^{-7} mol）、CdCl₂（ 6×10^{-6} mol）及びNa₂S·9H₂O（ 6×10^{-6} mol）を加え、攪拌機（750rpm）で20分間攪拌した。得られたポリエチレングリコール化半導体（CdS）微粒子（粒径4nm）を励起波長300nmにて蛍光を測定したところCdS微粒子特有の強い蛍光が現れた。

例5：ポリエチレングリコール化微粒子のセンサーチップ表面への固定化：

(1) センサーチップ表面の調製

N-スクシンイミジル-3-（2-ピリジルジチオ）プロピオネート（SPDP）とSPDPのジスルフィド結合還元剤であるジチオスレイトール（DTT）をそれぞれ1mM、2mMとなるように混合したエタノール溶液をセンサーチップの金表面に2時間反応させた。その後、洗浄した金表面をこの溶液に30分浸漬させ、さらに、0.1mg/mlストレプトアビシンPBS溶液（pH 6.4）を20分間流することで、金表面のストレプトアビシン化を行った。

(2) 例2に従って得られたPEG(Acetal-PEG-SH)化金微粒子を調製後、pH2に金微粒子溶液を調整し、2時間アセタール基の脱保護を行い、アルデヒド基に変換した。溶液をpH6に調整し、PEGに対して4倍量のビオチンヒドラジドを添加し、6時間攪拌しながら反応させた（ここで、PEGに対して4倍量とは、金微粒子の表面積を粒径から算出し、PEGの表面密度を0.25~0.40本/nm²と仮定し、微粒子の個数からPEGの本数を算出した値である。通常表面密度は0.25を使っている。0.25の値はPEG化金微粒子のT_gから算出したものである）。その後、NaBH₄を加え3日間攪拌した。遠心精製後、10mM-PBS(pH 6.4)を溶媒置換溶液を調製した。こう

して得られたビオチニル化されたPEG化金微粒子溶液に(1)で調製した金表面を有するチップを浸漬することにより、該表面にPEG化金微粒子が固定された。

(3) 表面の特性

(2)で調製されたPEG化金微粒子固定化表面を0.1mg/m²ウシ血清アルブミン(BSA)PBC溶液(pH6.4)に1時間浸漬させ、表面への吸着量をSPRにより測定した。その結果、未処理の金表面に対するBSA吸着はSPR角度変化より $\Delta\theta = 0.21^\circ$ であったが、PEG化金微粒子固定化表面においては、 $\Delta\theta = 0.02^\circ$ であった。これらのデータは、PEG化金微粒子固定化表面は血液中のタンパク質BSAの、非特異的吸着を抑制することを示す

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 生体成分の非特異吸着が抑制され、かつ感度を高めることのできるバイオセンサーチップ表面の提供。

【解決手段】 ポリエチレングリコール化金属微粒子を表面に担持するバイオセンサーチップ表面。

【選択図】 なし

出願人履歴情報

識別番号 [396020800]
1. 変更年月日 1998年 2月24日
[変更理由] 名称変更
住 所 埼玉県川口市本町4丁目1番8号
氏 名 科学技術振興事業団